

2,4-D 对赤子爱胜蚓抗氧化系统和基因表达的影响

张榜军¹,张佳乐¹,陈联合国²

(1.河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007;2.中国科学院 水生生物研究所,武汉 430072)

摘要:2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)是最常用的除草剂之一.大规模的使用导致其进入土壤环境中,但其对土壤生物的毒性及其作用机制还不完全清楚.通过滤纸接触法研究了 2,4-D 对赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)抗氧化系统和功能基因表达的影响.结果表明,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)、总抗氧化能力(T-AOC)和谷胱甘肽(GSH)随暴露时间的延长或暴露剂量的增加呈现先升高后降低的趋势,而丙二醛(MDA)在暴露 3 d 和 5 d 时出现显著升高,说明 2,4-D 暴露损害了蚯蚓机体抗氧化系统,最终导致脂质过氧化物的发生.热休克蛋白 70(*hsp70*)钙网蛋白(*crt*)基因发生了显著变化,表明 *hsp70* 和 *crt* 作为分子伴侣在保护细胞免受氧化损伤中可能起重要作用.*Annetocin*(*ann*)基因的显著下调,表明 2,4-D 暴露影响蚯蚓生殖,而翻译调节肿瘤蛋白(*tctp*)基因的抑制可能会影响蚯蚓细胞生长,使细胞更易于发生细胞凋亡.实验结果说明,2,4-D 可进入蚯蚓并干扰其抗氧化系统和 *hsp70*,*crt*,*ann* 和 *tctp* 基因表达,造成机体氧化损伤并影响其生长和繁殖.

关键词:2,4-二氯苯氧乙酸;赤子爱胜蚓;抗氧化酶;基因表达

中图分类号:X171.5

文献标志码:A

2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid,2,4-D)是一种苯氧乙酸类化合物,在低浓度时可调节植物生长,促进细胞分裂和伸长;当质量浓度达到 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,它可作为一种除草剂发挥作用^[1].因其成本低、选择性好、除草效果好等优点,从 2001 年开始 2,4-D 已成为农业市场上第 7 种常用的除草剂^[2].目前已有 1 500 多种除草剂产品以 2,4-D 为主要成分^[3].美国每年大约使用 2,4-D 类除草剂 13 000~15 000 t,而我国每年约使用 5 000~8 000 t 2,4-D 丁酯用于控制小麦、大豆、玉米等农作物杂草^[1].大量使用 2,4-D 类除草剂最终导致了其在环境中的残留.据报道,2,4-D 在淡水中的残存量为 $4 \sim 24 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,最高达 $4 000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[4],在环境中的半衰期介于 20~312 d 之间,属中等持久性的化学物质^[1,3].2,4-D 还可导致人中毒症状发生,包括呕吐、腹痛、腹泻、低血压、精神错乱、攻击性或奇异行为^[5].流行病学调查发现长期接触 2,4-D 可增加霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤及软组织肉瘤的发病风险^[6].鉴于 2,4-D 的潜在危害,国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer,IARC)已将其列为 2b 类致癌物.

研究表明 2,4-D 能够对斑马鱼^[3]、大肠杆菌^[7]、大鼠^[8]等产生毒害作用,但其对土壤生物的影响报道较少.蚯蚓是一类重要的土壤生物,约占土壤生物量的 80%,可以将有机垃圾和生物降解材料分解为营养成分,因此在土壤养分含量的维持和发展中起重要作用^[9].此外,蚯蚓在实验室中易于培养,对环境污染比较敏感,常作为评价污染物对土壤生态系统影响的模式生物^[10].污染物可以通过肠道消化和皮肤吸收途径对蚯蚓进行暴露,滤纸接触实验是研究污染物经过皮肤吸收途径对蚯蚓进行暴露的实验方法.虽然滤纸接触法忽略了土壤成分贡献,但是它具有高重复性和易于直接比较结果的优点^[11-12].

研究表明,2,4-D 可诱导细胞活性氧(reactive oxygen species,ROS)过量产生^[13].而过量的 ROS 会损伤细胞中的生物大分子,如脂质、核酸和蛋白质^[14].为了避免活性氧的有害影响,生物已发展了一套有效的清除系统,包括酶抗氧化剂,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、过氧化氢酶(catalase,CAT)和过氧

收稿日期:2021-01-25;修回日期:2021-03-31.

基金项目:河南省高等学校重点科研项目计划(19zx011)

作者简介:张榜军(1978—),男,河南林州人,河南师范大学校聘副教授,博士,研究方向为污染生态学.

通信作者:陈联合国,中国科学院水生生物研究所研究员,博士生导师,E-mail:lchenam@ihb.ac.cn.

化物酶(peroxidase, POD)以及非酶抗氧化剂,如谷胱甘肽(glutathione, GSH)^[15].同时,外源化合物在细胞和组织水平的影响通常与基因表达改变有关^[16].*Annetocin* (*ann*)是一种蚯蚓中的生殖激素生物标记物,与蚯蚓繁殖行为直接相关^[17].热休克蛋白70(*heat shock protein 70*, *hsp70*)、翻译调节肿瘤蛋白(*translation-regulated tumor protein*, *tctp*)和钙网蛋白(*calreticulin*, *crt*)是应激诱导蛋白,其变化可在污染物暴露的早期发现^[18].因此,本实验研究了不同质量浓度2,4-D对赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)抗氧化系统和功能基因(*ann*, *hsp70*, *tctp* 和 *crt*)表达的影响.实验结果为评估土壤环境中2,4-D的生态风险提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

2,4-D(质量分数:97%)购自阿拉丁试剂有限公司;SOD,CAT,POD,谷胱甘肽S转移酶(glutathione S-transferase, GST),总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC),GSH,丙二醛(malondialdehyde, MDA)和蛋白含量测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Trizol购自宝生物;HiFi-Script cDNA第一链合成试剂盒和UltraSYBR Mixture试剂盒购自康为世纪;其他所有试剂均为分析纯.

赤子爱胜蚓(*E. fetida*)购自江苏省句容市王军蚯蚓养殖场.蚯蚓养殖在发酵牛粪中,置于(20±1)℃,80%湿度,光暗比12h:12h的培养箱中养殖2周.随后,挑选2~3月龄,300~350mg的具有生殖环带的健康蚯蚓用于实验.实验前24h,将蚯蚓取出,去离子水冲洗,置于清洁湿润滤纸上放培养箱24h,使肠内容物排泄.

1.2 滤纸接触实验

根据经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)标准方法^[10,19],进行2,4-D对蚯蚓滤纸接触实验的急性毒性实验.2,4-D暴露浓度为0、2.5、3.2、4.0、5.0、6.3、8.0、10.1g·L⁻¹.每组10条蚯蚓.实验在(20±1)℃的培养箱中进行,观察48h和72h后的死亡率.实验结果采用改良寇氏法计算2,4-D对赤子爱胜蚓48h和72h的半致死浓度(medium lethal concentration, LC₅₀)值.在急性毒性的基础上,设置2,4-D对蚯蚓的亚致死暴露质量浓度为0、0.5、1和2g·L⁻¹,暴露过程同急性毒性实验.在1d、3d和5d取样,每组取蚯蚓7条,4条用于生化指标测定,3条用于基因表达测定.

1.3 生化指标测定

蚯蚓用PBS(磷酸盐缓冲液)匀浆,取适量用于测定MDA;剩余匀浆液12000g4℃离心10min,上清液分装后-20℃保存.SOD,CAT,POD,GST,GSH,MDA,T-AOC和蛋白含量测定按照各试剂盒说明书进行.

1.4 基因表达测定

用Trizol法提取蚯蚓的RNA.采用反转录试剂盒进行cDNA合成,在LightCycle 96上,用UltraSYBR Mixture试剂盒在进行荧光定量反应.*hsp70*,*ann*,*tctp*,*crt*和 β -*actin*所用引物如表1.PCR扩增反应按照试剂盒说明书进行.结果计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[20].

表1 用于荧光定量PCR的引物序列

Tab. 1 Primer sequences for fluorescence quantitative PCR

基因名称	Forward	Reverse
<i>hsp70</i>	CCAAGGACAACAACCTGCTC	CGGCGTTCTTACCATTTC
<i>ann</i>	TTTCTTCCGCTGCTTTG	ACCGACTACCACCGACA
<i>tctp</i>	TCGAATATGCCCTCAGCA	TGGACTCGCCACAGAAGA
<i>crt</i>	GCCGAACCGACTACCTAC	GGCTGAGATGCCGTAAAA
β - <i>actin</i>	TCCATCGTCCACAGAAAG	AAATGTCTCCGCAAGCT

1.5 统计分析

所有统计分析均使用SPSS 16.0,实验结果表示为平均值±标准差(SD).采用单因素方差分析确定各样本间是否存在显著差异,然后进行Dunnnett *t* 检验.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 表示差异显著和差异极显著.

2 结果与分析

2.1 LC₅₀

2,4-D对蚯蚓的 48 h LC₅₀ 为 5.53 g · L⁻¹, 95% 置信区间为 4.75 ~ 6.43 g · L⁻¹; 72 h LC₅₀ 为 5.04 g · L⁻¹, 95% 置信区间为 4.29 ~ 5.92 g · L⁻¹.

2.2 2,4-D对蚯蚓抗氧化酶活性的影响

2,4-D暴露蚯蚓 3 d 和 5 d 时发现低浓度组(0.5 g · L⁻¹)SOD 酶明显升高,而高浓度组(2 g · L⁻¹)显著降低(图 1(a)).所有处理组在 2,4-D 暴露蚯蚓 1 d 时 CAT 活性均显著增加,3 d 时 0.5 g · L⁻¹ 仍然明显升高.但是,2,4-D 暴露蚯蚓 5 d 时,1 g · L⁻¹ 和 2 g · L⁻¹ 组显著抑制了 CAT 酶活性(图 1(b)).1 d 时,0.5 g · L⁻¹ 组 POD 酶活性和对照组相比显著升高,到 3 d 时依然升高.但是,2 g · L⁻¹ 组在 3 d 时明显抑制了蚯蚓 POD 酶活性.同时,所有处理组蚯蚓 POD 酶活性在 5 d 时和对照组相比也被显著抑制(图 1(c)).0.5 g · L⁻¹ 处理组在 2,4-D 暴露 1 d 和 5 d 时 GST 酶活性和对照组相比显著升高.同时,1 g · L⁻¹ 组 GST 酶活性在 1 d 时也明显增加(图 1(d)).

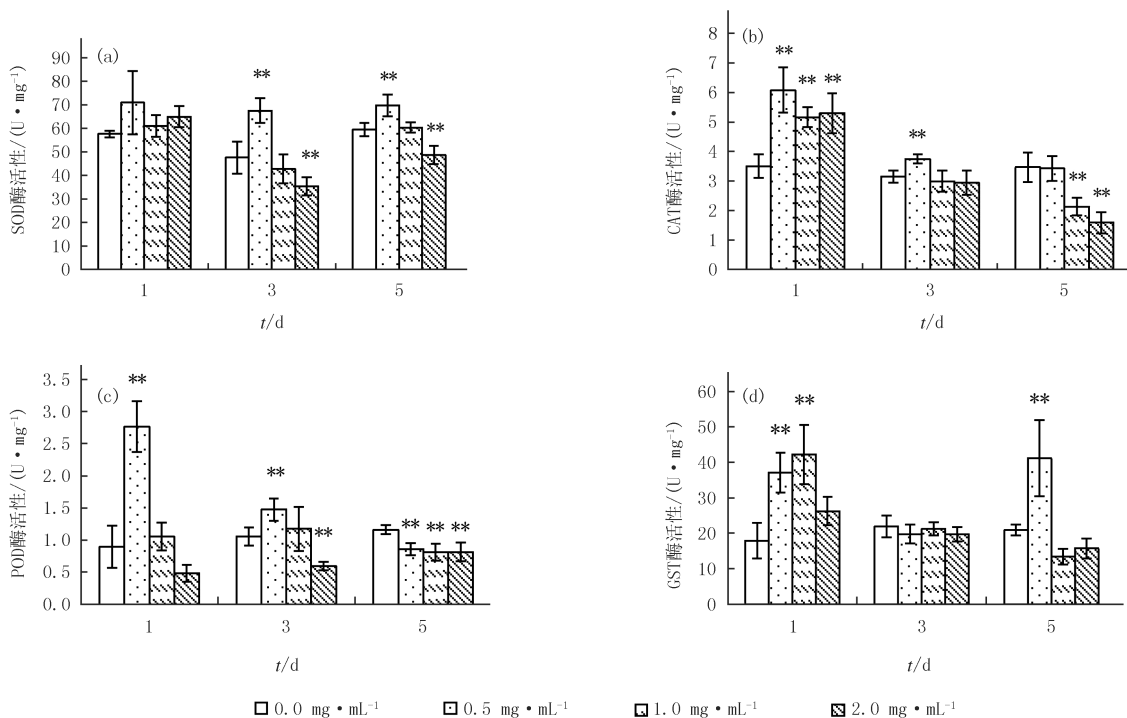


图1 2,4-D暴露对蚯蚓SOD(a), CAT(b), POD(c)和GST(d)酶活性的影响

Fig.1 Effects of 2,4-D on SOD(a), CAT(b), POD(c) and GST(d)activities in earthworm

2.3 2,4-D对蚯蚓 T-AOC、GSH 和 MDA 的影响

1 d 时,2 g · L⁻¹ 组 T-AOC 和对照组相比显著升高.3 d 时,0.5 g · L⁻¹ 和 1 g · L⁻¹ 组显著升高而 2 g · L⁻¹ 组显著下降.当 2,4-D 暴露 5 d 时,2 g · L⁻¹ 组和对照组相比依然显著下降(图 2(a)).2,4-D 暴露 1 和 3 d 时,处理组 GSH 含量高于对照组.而到 5 d 时,低质量浓度 2,4-D(0.5 g · L⁻¹) 暴露显著升高,而高质量浓度组(1 g · L⁻¹ 和 2 g · L⁻¹)GSH 含量显著下降(图 2(b)).3 d 时,2 g · L⁻¹ 组 MDA 含量明显高于对照组.随着暴露时间的延长(5 d),1 和 2 g · L⁻¹ 处理组 MDA 均显著高于对照组(图 2(c)).

2.4 2,4-D对蚯蚓基因表达的影响

2,4-D 暴露 1 d 时,0.5 g · L⁻¹ 处理组 *ann* 基因和对照组相比显著升高.3 d 时,对照组和处理组之间没有显著差异.2,4-D(0.5 g · L⁻¹ 和 2 g · L⁻¹) 暴露 5 d 显著抑制了 *ann* 基因表达(图 4(a)).暴露 3 d 时,

0.5 g · L⁻¹和 2 g · L⁻¹处理组 *tctp* 基因和对照组相比显著升高.在暴露结束时(5 d),所有处理组 *tctp* 基因表达量均明显低于对照组(图 4(b)).0.5 g · L⁻¹处理组在 2,4-D 暴露 1 d 时 *hsp70* 基因表达量和对照组相比显著升高.5 d 时,1 g · L⁻¹处理组 *hsp70* 也显著升高(图 4(c)).2,4-D 暴露蚯蚓 1 d 时, *crt* 基因表达量在 1 g · L⁻¹和 2 g · L⁻¹处理组显著升高.但是暴露 3 d 时,0.5 g · L⁻¹和 1 g · L⁻¹处理组 *crt* 基因表达量显著下降而 2 g · L⁻¹处理组依然升高.实验结束时(5 d),所有处理组 *crt* 基因表达量均显著下降(图 4(d)).

3 讨论

3.1 2,4-D 对蚯蚓抗氧化系统的影响

众所周知,环境应激会引起生物机体氧化应激和细胞氧化还原平衡的改变.而抗氧化系统被认为是保护生物大分子免受氧化损伤的主要防御系统.SOD 是生物体内抵抗 ROS 的第一道防线,可催化高活性超氧阴离子向 H₂O₂ 的歧化,而 CAT 和 POD 能将 H₂O₂ 降解为 H₂O 和 O₂^[21].ZHANG 等^[22]发现 2,4-D 暴露显著降低了小鼠睾丸 SOD 和 CAT 酶的活性.本实验结果发现,2,4-D 暴露蚯蚓 3 d 后低浓度组(0.5 g · L⁻¹)SOD、CAT 和 POD 显著升高,表明这些酶参与了机体 ROS 的清除.但是,随着浓度的增加或暴露时间的延长,2,4-D 显著抑制了 SOD, CAT 和 POD 酶的活性.这个结果可能是由于机体内 ROS 的积累,随后抑制了酶活性;也可能是蚯蚓为了抵抗机体的氧化应激,消化了过多的抗氧化酶而导致其下降.

T-AOC 反映了生物体的总抗氧化状态,包括酶和非酶抗氧化剂.机体抗氧化水平的维持对于预防和处理大量的应激状态具有重要意义.因此,T-AOC 被认为是氧化应激程度的一个敏感而可靠的标志物^[23].本实验结果表明,2,4-D 暴露蚯蚓 1 d 时 2 g · L⁻¹处理组和 3 d 时 0.5 g · L⁻¹和 1 g · L⁻¹处理组 T-AOC 显著升高,说明对 ROS 的清除能力增强.但是,2 g · L⁻¹处理组暴露 3 d 和 5 d 时 T-AOC 显著下降,说明 2,4-D 暴露蚯蚓可能诱导产生了氧化应激.

GSH 是维持细胞氧化还原平衡的一个关键蛋白,参与调节细胞信号和修复途径^[24].同时,GSH 直接参与解毒反应.GST 在机体内催化 GSH 和有毒化学物的结合反应,在保护组织免受氧化应激中起着重要作用^[25].本实验发现,GSH 在 2,4-D 暴露 1 d 和 3 d 时含量升高.同时,GST 酶活性在 1 d 时也显著升高,说明 GSH 和 GST 可能在保护机体免受 2,4-D 毒性中起重要作用.

过量 ROS 能够攻击多不饱和脂肪酸并导致脂质过氧化.MDA 是脂质过氧化的最终产物,可以容易地与生物大分子如蛋白质、脂蛋白和 DNA 功能基团相互作用,从而导致细胞损伤^[26].本实验结果表明,2,4-D 暴露蚯蚓 3 d 和 5 d 时高质量浓度组 MDA 和对照组相比显著升高,表明 2,4-D 暴露诱导了蚯蚓脂质过氧化的产生.

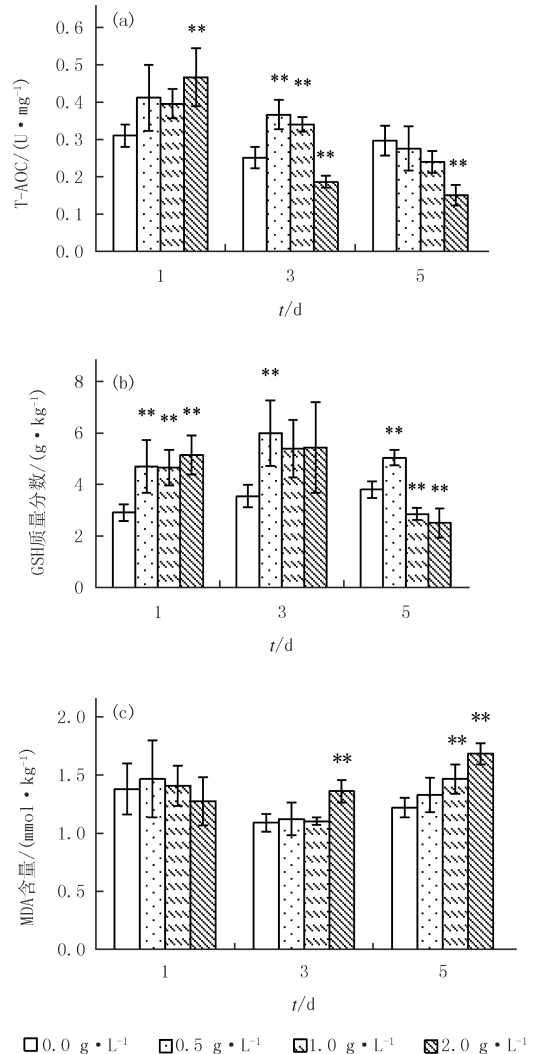
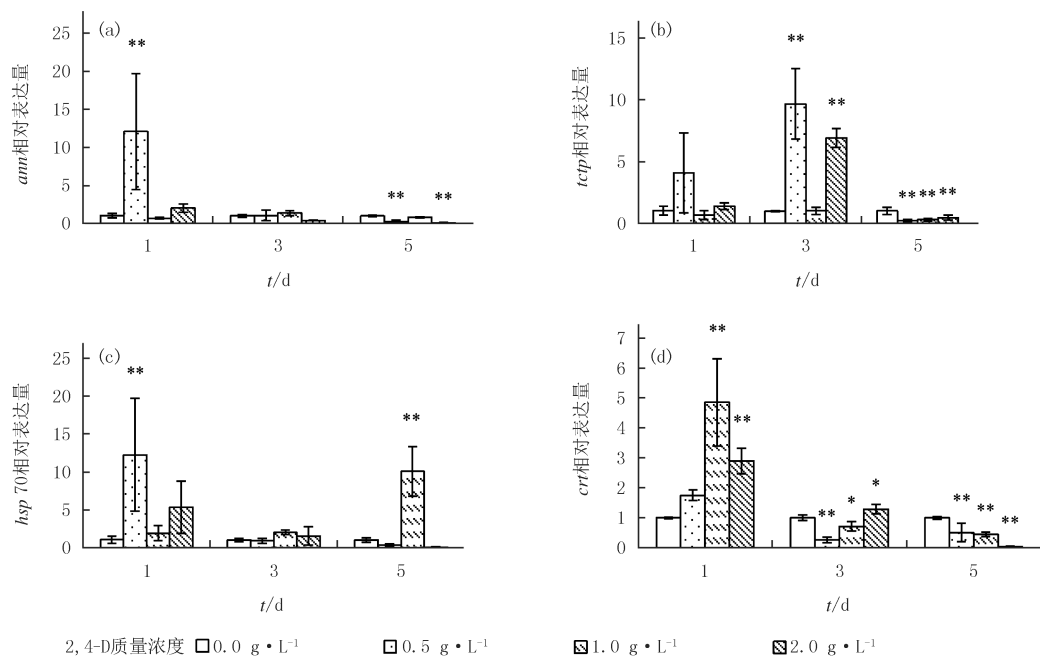


图2 2,4-D 暴露对蚯蚓 T-AOC(a)、GSH(b) 和 MDA(c) 含量的影响
Fig.2 Effects of 2,4-D on T-AOC(a), GSH(b) and MDA(c) contents in earthworm

图3 2,4-D暴露对蚯蚓 ann (a)、 tcp (b)、 $hsp70$ (c)和 crt (d)基因表达的影响Fig. 3 Effects of 2,4-D on ann (a), tcp (b), $hsp70$ (c) and crt (d) genes expression in earthworm

3.2 2,4-D对蚯蚓功能基因的影响

ANN是一种与催产素相关的神经肽激素,可以控制蚯蚓的产卵行为.研究表明,在蚯蚓毒性实验中, ann 基因的相对表达水平可作为生殖生物标志物^[27].本实验结果表明,2,4-D暴露1 d时,低质量浓度组 ann 基因和对照组相比显著升高.然而,2,4-D暴露5 d时高质量浓度组显著抑制了 ann 基因表达. ann 基因表达的改变说明2,4-D暴露可能影响蚯蚓的生殖.

TCTP是一个生长相关蛋白,在细胞生长和分裂中起重要作用.此外,TCTP在预防细胞凋亡和肿瘤逆转中起着重要作用^[28-29].本实验结果表明,0.5 g·L⁻¹和2 g·L⁻¹处理组2,4-D暴露蚯蚓3 d时 tcp 基因和对照组相比显著升高.而所有处理组 tcp 基因表达量在5 d时被显著抑制. tcp 基因的抑制可能会影响蚯蚓细胞生长,可能更易于发生细胞凋亡.

HSP70是生物体内的重要蛋白质,在维持细胞的生命过程中起着重要作用.HSP70具有保护细胞免受胁迫引起的损伤的能力^[27].本实验结果发现,仅发现0.5 g·L⁻¹处理组暴露1 d,1 g·L⁻¹处理组暴露5 d $hsp70$ 基因表达量和对照组相比显著升高.实验结果表明 $hsp70$ 基因表达的改变可能取决于暴露的强度和持续时间.

CRT是一种Ca²⁺结合的分子伴侣,主要存在于内质网中.CRT对氧化损伤的保护和Ca²⁺缓冲方面起着至关重要的作用,而CRT的增加代表了细胞氧化应激反应的产生^[30].本实验结果表明,2,4-D暴露蚯蚓1 d时高质量浓度组 crt 显著升高,说明2,4-D可能对蚯蚓产生了氧化胁迫.当2,4-D暴露3 d和5 d时,蚯蚓大部分处理组 crt 表达显著下降,表明 crt 可能失去细胞对氧化损伤的保护作用.

本实验结果表明,2,4-D暴露蚯蚓后引起其体内ROS升高.在此过程中,蚯蚓机体抗氧化剂GSH和抗氧化酶SOD,CAT,POD和GST参与清除过量产生的ROS.同时, $hsp70$ 和 crt 基因表达的变化也表明细胞氧化应激的产生^[27,30].研究发现TCTP过表达对过氧化氢诱导的中国仓鼠卵巢细胞系CHO-K1细胞死亡起保护作用^[31].因此,本实验中2,4-D暴露5 d时 tcp 基因的抑制表明蚯蚓对ROS损伤保护能力的下降.随着机体抗氧化能力的下降,MDA含量显著升高,说明2,4-D暴露最终导致蚯蚓氧化损伤.同时,2,4-D暴露干扰了蚯蚓 ann 基因表达,进而可能影响蚯蚓生殖行为.

4 结 论

1)在2,4-D暴露作用下,蚯蚓的抗氧化防御系统(SOD,CAT,POD,T-AOC和GSH)均呈现先升高后降低的趋势,说明2,4-D暴露后可引起氧化应激,在持续时间长或暴露剂量大的情况下抗氧化防御能力下降,导致蚯蚓氧化损伤。

2)2,4-D暴露能引起 *hsp70*、*tctp* 和 *crt* 基因改变,表明这些基因在保护细胞免受氧化损伤中可能起重要作用。*ann* 和 *tctp* 基因的改变说明2,4-D暴露可能影响蚯蚓生殖和细胞生长。

参 考 文 献

- [1] ISLAM F,WANG J,FAROOQ M A,et al.Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems[J].Environment International,2018,111:332-351.
- [2] STACKELBERG K V.A systematic review of carcinogenic outcomes and potential mechanisms from exposure to 2,4-D and MCPA in the environment[J].Journal of Toxicology,2013,2013:371610.
- [3] LI K,WU J Q,JIANG L L,et al.Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos[J].Chemosphere,2017,171:40-48.
- [4] GAAIED S,OLIVEIRA M,DOMINGUES I,et al.2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide effects on zebrafish larvae:development,neurotransmission and behavior as sensitive endpoints[J].Environ Sci Pollut Res,2020,27(4):3686-3696.
- [5] BRADBERRY S M,PROUDFOOT A T,VALE J A.Poisoning due to chlorophenoxy herbicides[J].Toxicol Rev,2004,23(2):65-73.
- [6] 张梦云,徐培渝.2,4-二氯苯氧乙酸的毒理学及流行病学研究进展[J].毒理学杂志,2014,28(2):156-159.
- [7] ZHANG M Y,XU P Y.Research advances on the toxicology and epidemiology of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid[J].J Toxicol,2014,28(2):156-159.
- [8] BHAT S V,KAMENCIC B,KÖRNIG A,et al.Exposure to sub-lethal 2,4-dichlorophenoxyacetic acid arrests cell division and alters cell surface properties in Escherichia coli[J].Front Microbiol,2018,9:44.
- [9] 李京,毛庆花,秦燕霞.2,4-二氯苯氧乙酸作用的鼠乳对幼鼠蓝斑核中多巴胺β-羟化酶表达的影响[J].中国现代医学杂志,2018,28(21):32-35.
- [10] LI J,MAO Q H,QIN Y X.Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on expression of dopamine beta hydroxylase in locus coeruleus of neonate rats[J].China J Mod Med,2018,28(21):32-35.
- [11] DATTA S,SINGH J,SINGH S,et al.Earthworms, pesticides and sustainable agriculture; a review[J].Environ Sci Pollut Res,2016,23(9):8227-8243.
- [12] OECD.Guideline for testing of chemicals, No. 207, Earthworm acute toxicity tests[S],1984.
- [13] MIYAZAKI A,AMANO T,SAITO H,et al.Acute toxicity of chlorophenols to earthworms using a simple paper contact method and comparison with toxicities to fresh water organisms[J].Chemosphere,2002,47(1):65-69.
- [14] EČIMOVIĆ S,VELKI M,VUKOVIĆ R,et al.Acute toxicity of selenate and selenite and their impacts on oxidative status,efflux pump activity,cellular and genetic parameters in earthworm Eisenia andrei[J].Chemosphere,2018,212:307-318.
- [15] TAYEB W,NAKBI A,CHERAIEF I,et al.Alteration of lipid status and lipid metabolism,induction of oxidative stress and lipid peroxidation by 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rat liver[J].Toxicol Mech Methods,2013,23(6):449-458.
- [16] YAO X,ZHANG F,QIAO Z,et al.Toxicity of thifluzamide in earthworm(Eisenia fetida)[J].Ecotoxicol Environ Saf,2020,188:109880.
- [17] WANG H,ZHANG X,WANG L,et al.Biochemical responses and DNA damage induced by herbicide QYR301 in earthworm(Eisenia fetida)[J].Chemosphere,2020,244:125512.
- [18] LYONS D D,PHILIBERT D A,ZABLOCKI T,et al.Assessment of raw and ozonated oil sands process-affected water exposure in developing zebrafish:Associating morphological changes with gene expression[J].Environ Pollut,2018,241:959-968.
- [19] CHEN C,XUE S,ZHOU Q,et al.Multilevel ecotoxicity assessment of polycyclic musk in the earthworm Eisenia fetida using traditional and molecular endpoints[J].Ecotoxicology,2011,20(8):1949-1958.
- [20] WANG X,ZHU X,PENG Q,et al.Multi-level ecotoxicological effects of imidacloprid on earthworm(Eisenia fetida)[J].Chemosphere,2019,219:923-932.
- [21] UWIZEYIMANA H,WANG M,CHEN W,et al.Ecotoxicological effects of binary mixtures of siduron and Cd on mRNA expression in the earthworm Eisenia fetida[J].Sci Total Environ,2018,610-611:657-665.
- [22] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J].Methods,2001,25(4):402-408.
- [23] BLOKHINA O,VIROLAINEN E,FAGERSTEDT K V.Antioxidants,oxidative damage and oxygen deprivation stress;a review[J].Ann

- Bot,2003,91(2):179-194.
- [22] ZHANG D L, WU Y L, YUAN Y Y, et al. Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces oxidative stress and apoptosis in mouse testis[J]. Pestic Biochem Phys, 2017, 141: 18-22.
- [23] GHISELLI A, SERAFINI M, NATELLA F, et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data[J]. Free Radical Biol Med, 2000, 29(11): 1106-1114.
- [24] CNUBBEN N H P, RIETJENS I M C M, WORTELBOER H, et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense [J]. Environ Toxicol Phar, 2001, 10: 141-152.
- [25] YU M, WANG S H, LUO Y R, et al. Effects of the 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids on the antioxidant defense system of *Daphnia magna* [J]. Ecotox Environ Safe, 2009, 72(6): 1798-1804.
- [26] HU S Q, ZHANG W, LI J, et al. Antioxidant and gene expression responses of *Eisenia fetida* following repeated exposure to BDE209 and Pb in a soil-earthworm system[J]. Sci Total Environ, 2016, 556: 163-168.
- [27] WANG J, CAO X F, SUN J H, et al. Transcriptional responses of earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to naphthenic acids in soil[J]. Environ Pollut, 2015, 204: 264-270.
- [28] TELERMAN A, AMSON R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(3): 206-216.
- [29] YANG X L, LI Y B, WANG X. Effects of ciprofloxacin exposure on the earthworm *Eisenia fetida* [J]. Environ Pollut, 2020, 262: 114287.
- [30] ŠILEROVÁ M, KAUSCHKE E, PROCHÁZKOVÁ P, et al. Characterization, molecular cloning and localization of calreticulin in *Eisenia fetida* earthworms[J]. Gene, 2007, 397(1/2): 169-177.
- [31] NAGANO-ITO M, ICHIKAWA S. Biological effects of mammalian translationally controlled tumor protein(TCTP) on cell death, proliferation, and tumorigenesis[J]. Biochem Res Int, 2012, 2012: 204960.

Effects of 2,4-D on the antioxidant system and the gene expression of the earthworm *Eisenia fetida*

Zhang Bangjun¹, Zhang Jiale¹, Chen Lianguo²

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) is one of the most commonly used herbicides in the world. However, the toxicity of 2,4-D to soil organisms and its mechanism of action are still not fully understood when it releases into soil environment due to its large-scale application. The effects of 2,4-D on the antioxidant system and the functional gene expression of *Eisenia fetida* were studied in the present study through filter paper contact method. The results showed that the activities of superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), peroxidase(POD), glutathione S-transferase(GST), and the contents of total antioxidant capacity(T-AOC) and glutathione(GSH) increased firstly and then decreased with the prolongation of exposure time or the increase of exposure dose, while malondialdehyde(MDA) increased significantly at 3 d and 5 d of exposure. These results indicate that 2,4-D exposure damages the antioxidant system of earthworm and eventually leads to lipid peroxidation. The expressions of *heat shock protein 70(hsp70)* and *calreticulin(crt)* gene are also significantly changed, suggesting that *hsp70* and *crt* may play an important role in protecting cells from oxidative damage. Significant downregulation of *annetocin(ann)* gene suggests that 2,4-D exposure affects reproduction, while inhibition of *translation-regulated tumor protein(tctp)* gene may affect the cell growth of earthworm and make cells more prone to apoptosis. These results suggest that 2,4-D could enter into earthworm and disturb the balance of the antioxidant system and the expression of *hsp70*, *crt*, *ann* and *tctp* genes, causing oxidative damage and affecting the growth and reproduction of earthworm.

Keywords: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; *Eisenia fetida*; antioxidant enzymes; gene expression

[责任编辑 刘洋 杨浦]